

Protoporphyrinogen Oxidase 저해 제초제의 작용기작과 선택성 이 회 재*

Mechanism of Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides and Their Selectivity

Hee Jae Lee*

I. 서 언

광활성 물질(photodynamic compounds)은 빛의 흡수에 의해 삼중항 상태(triplet state)의 분자산소(3O_2 , molecular oxygen)로부터 활성산소(active oxygen species ; superoxide anion, hydroperoxyl radical, H_2O_2 , singlet oxygen)를 만드는 물질을 말하며²³⁾ 이 활성산소는 반응성이 매우 높아 전자가 많은 곳을 공격하게 되는데 세포막의 주요 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 막지질 과산화작용(membrane lipid peroxidation)을 일으켜 원형질막을 비롯한 여러 세포내 소기관의 막을 파괴되고 심하면 식물체를 죽게 한다^{21,23)}. 그러므로 광활성 물질은 천연인 것이든 합성한 것이든 제초제로서의 역할을 할 수 있다. 그러나 제초제 자체가 광활성 물질인 경우에는 비선택적인 독성을 나타내게 되므로 대상 식물에만 광활성 물질을 축적케 하는 제초제가 더욱 큰 가치를 가지게 된다. 이러한 관점에서 식물체내에서 엽록소와 heme을 만드는 과정인 porphyrin 합성 경로(Fig. 1)는 제초제의 매우 중요한 작용점이 된다^{2,14,16,17)}. 왜냐하면 porphyrin 합성 경로의 여러 중간 물질들이 광활성 물질이고 식물체내에 비정상적으로 축적되면 식물체가 죽게 되기 때문이다^{14,16)}.

Diphenyl ether(DPE)계 제초제를 비롯한 몇

가지 상용화된 제초제들은 porphyrin 합성 경로

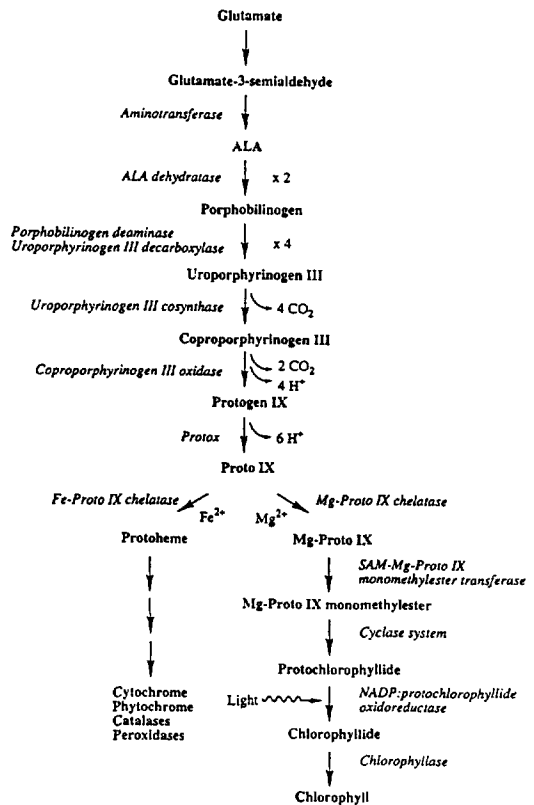


Fig. 1. The porphyrin biosynthesis pathway in higher plants. The pathway intermediates and products are in bold fonts, and enzymes are in italics.

* 전남대학교 생물공학연구소(Institute of Biotechnology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea) <'97. 8. 12 접수>

를 저해하여 광합성 물질을 식물체내에 축적케 함으로써 제초 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다^{14,16,17,49,64}. 본 총설에서는 이들 제초제의 작용기작과 선택성에 대해 논하고자 한다.

II. 작용특성

DPE계 제초제는 1960년대에 처음 소개된 이후 같은 계열의 여러 제초제가 상품화되어 널리 사용되고 있다(Fig. 2). 이러한 DPE계 제초제는 모두 *para* 위치에 nitro기로 치환되어 있는 특징이 있다^{16,64}. 이들 제초제는 세계적 주요 작물인 대두, 벼, 목화, 땅콩 등의 재배지에 발생하는 일년생 화본과잡초와 광엽잡초를 방제하는데 광범위하게 사용되고 있는 살초범위가 넓은 중요한 제초제로서 5~20g/ha 정도의 극미량 처리로도 제초 효과가 탁월할 뿐만 아니라 비수용성으로 식물체나 토양입자에 쉽게 흡착되며 광산화에 의해 곧바로 분해되기 때문

에 잔류독성이 낮은 장점이 있다⁶⁴.

이들 제초제는 paraquat나 diquat와 같은 bipyridinium계 제초제와 마찬가지로 광상태하에서 식물체의 급격한 탈수와 탈색을 일으키는 접촉형 제초제이다^{6,16,19,64}. 그러나 DPE계 제초제의 작용은 bipyridinium계 제초제처럼 광합성 과정에 직접적으로 관련되어 있는 것이 아니라 엽록체의 외막이 이들 제초제의 작용 부위이며^{12,37,39,46} 엽록체막보다는 원형질막이나 액포막을 먼저 파괴한다^{16,33,44}. 외관상으로는 잎에 수침형(water soaked appearance)의 증상이 반점의 형태로 나타나고 심해지면 괴사된다. 이들 제초제를 처리한 식물체에는 광상태하에서 원형질막 파괴에 따른 세포내 구성물질의 누출이 가장 먼저 이루어지고 ethane과 malondialdehyde의 과다생성, ascorbate와 reduced glutathione 함량의 감소 및 엽록소와 카로티노이드의 파괴 등 전형적인 막지질 과산화작용의 결과들이 나타난다^{4,16,24,33,36,40,72}.

III. 작용기작

1. Protoporphyrin IX의 축적

DPE계 제초제의 작용에는 반드시 빛이 필요하고 식물체에 나타나는 증상이 막지질 과산화작용의 결과이기 때문에 이들 제초제의 작용에 어떠한 광수용체(photoreceptor)가 관여하고 있으며 광수용체로부터 발생하는 활성산소에 의해 살초작용이 이루어지는 것으로 추측할 수 있다. DPE계 제초제의 작용에 관여하는 광수용체는 DPE계 제초제 자체가 아니라 DPE계 제초제에 의해 식물체내에 축적되는 protoporphyrin IX(Proto IX)이다^{4,5,15,45,49,50,62,71}. Proto IX은 엽록소와 heme를 만드는 porphyrin 합성 경로의 중간 물질로 4개의 pyrrole 링이 짝을 이루고 있는 이중결합으로 연결된 평면구조로 되어 있는 광활성 물질이다^{2,14}. 즉 Proto IX은 빛을 흡수하여 삼중항 상태(triplet state)의 분자 산소로부터 일중항 상태(singlet state)의 산소를 발생시켜 지질 과산화작용을 일으키게 된다^{14,24} (Fig. 3). Porphyrin 합성 과정의 δ -aminolevulin-

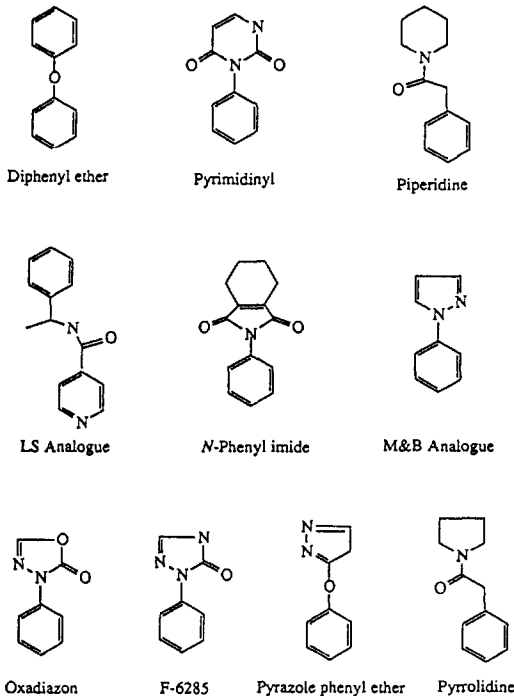


Fig. 2. Representative Protox-inhibiting herbicides from different chemical classes.

nic acid(ALA) 합성효소 저해제인 gabaculine 이나 ALA 탈수효소 저해제인 4,6-dioxoheptanoic acid, 4,5-dioxovaleric acid 또는 levulinic acid 를 처리하면 DPE계 제초제의 효과가 소멸되며^{7,10,32,36,45,51,72} ALA 합성효소의 최종산물 저해제(feedback inhibitor)인 hemin을 처리하여도 이들 제초제의 효과가 소멸된다^{3,50}. 또한 Proto IX의 흡광 스펙트럼은 DPE계 제초제의 작용 스펙트럼과 거의 일치하며⁶² 이들 제초제에 의해 나타나는 식물체의 손상은 Proto IX의 축적량과 밀접한 상관관계가 있다^{4,40,50,54}. DPE계 제초제 이외에도 oxadiazole, phenyl pyrazole, pyrazole phenyl ether, N-phenyl imide계 등의 제초제들도 식물체내에 Proto IX의 축적을 일으킨다^{17,40,52,53,54,55,58,62,66,72}.

2. Protoporphyrinogen oxidase의 저해 DPE계 제초제와 이와 구조적으로 관련된 여

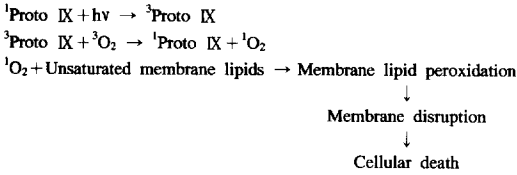


Fig. 3. Proto IX-mediated type II photoperoxidation of membrane lipids.

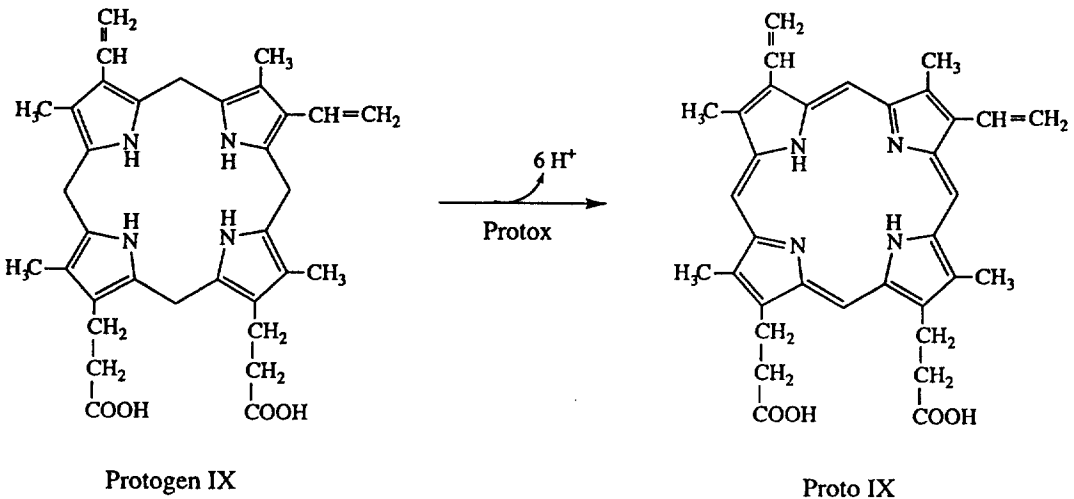


Fig. 4. Oxidation of Protoporphyrin IX to Proto IX by the action of Protox.

러 제초제들은 porphyrin 합성 과정에서 protoporphyrinogen IX(Proto IX)이 Proto IX으로 산화되는 과정을 촉매하는 효소인 protoporphyrinogen oxidase(Protox)의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다^{14,16,17,47,64,72}. Protox에 의해 Protoporphyrinogen IX이 Proto IX으로 산화되는 과정에는 Protoporphyrinogen IX 분자에 있는 2개의 pyrrole 링의 2차 아민이 3차 아민으로 변환되며 총 6개의 전자가 이탈된다(Fig. 4). 식물에는 색소체와 미토콘드리아에 Protox가 존재하는데^{29,37,46,68} 이 2가지 형태의 Protox는 물리화학적 특성이 거의 동일하며 모두 DPE계 제초제에 대해 매우 민감하여 I₅₀값(50% 저해 농도)이 감수성 식물의 경우 제초제의 종류에 따라 0.4nM~4 μM의 수준이다^{14,16,17,54,58,64}. DPE계 제초제에 의한 Protox의 저해는 경쟁적 저해에 의해 이루어져 DPE계 제초제는 Protox의 기질인 Protoporphyrinogen IX이 결합하는 Protox의 특정 부위에 경쟁적으로 결합한다^{8,48,53,54,58,69}. Protox에 대한 DPE계 제초제의 결합상수(binding constant)는 Protox 활성에 대한 저해상수(inhibition constant)와 매우 밀접한 상관관계를 나타내며^{53,54,58} DPE계 제초제를 비롯한 여러 가지 Protox 저해 제초제의 분자구조적 특성은 모두 2개의 링을 가진 것으로 Protox의 기질인 Protoporphyrinogen IX의 반쪽과 매우 흡사한 구조적 유사체(structural analogues)이며

Protox의 반쪽과 흡사할수록 더욱 강력한 Protox의 저해제가 된다^{53,54,58}.

3. 작용기작

색소체에서의 Protox의 위치는 스트로마가 아니라 색소체의 외막이며^{37,46} Protox의 기질인 Protoxenol은 반응 산물인 Proto IX에 비해 친유성(lipophilicity) 정도가 월등히 낮다^{17,38,39}. 그러므로 DPE계 제초제에 의해 색소체 외막에 있는 Protox가 저해되면 Protoxenol은 색소체 외막에 축적되지 못하고 색소체 바깥으로 이동되어 다른 어떤 부위에서 Proto IX으로 산화될 수 있다면 DPE계 제초제에 의해 Protox가 저해되면 이 효소의 기질인 Protoxenol이 아니라 반응 산물인 Proto IX으로 산화되어 어떻게 식물체내에 축적되는지 설명할 수 있다. DPE계 제초제를 식물체에 처리한 후 형광현미경으로 관찰하면 Proto IX의 축적이 주로 색소체 바깥에서 이루어지고⁴⁴ 실제로 DPE계 제초제 acifluorfen-methyl을 처리한 보리의 색소체에서 Protoxenol이 색소체 바깥으로 이동된다는 사실이 증명된 바 있다²⁸. 또한 미토콘드리아는 Protox를 가지고 있지만 기질인 Protoxenol은 만들 수 없기 때문에^{37,68} heme의 합성이 정상적으로 이루어지기 위해서는 제초제를 처리하지 않은 식물에서도 Protoxenol이 색소체로부터 미토콘드리아로 이동되어야 한다⁶⁸. 원형질막은 DPE계 제초제에 의한 손상이 가장 먼저 일어나는 곳 중 하나인데^{16,33} 색소체나 미토콘드리아에서와 마찬가지로 원형질막에서도 Protoxenol을 산화시킬 수 있는 효소적 활성이 존재한다는 사실이 확인되었다^{31,39,42}. 원형질막에서의 이러한 Protox 유사효소(Protox-like enzyme)는 색소체의 Protox와는 달리 DPE계 제초제에 의해 활성이 저해되지 않는다^{31,39,42}. 또한 원형질막의 Protox 유사효소는 색소체의 Protox에 비해 dithiothreitol, ascorbate, glutathione 등의 환원제에 의해 더욱 뚜렷하게 저해되며^{39,42} DPE계 제초제에 의한 색소체 Protox의 활성 저해는 환원제의 첨가로 증대된다^{39,41,42}. 정상적인 세포의 색소체는 환원된 상태의 환

경을 가지고 있지만 원형질막은 그렇지 않은 세포내 구성요소라는 사실을 고려하면 색소체의 Protox는 DPE계 제초제에 매우 민감하나 원형질막의 Protox 유사효소는 매우 둔감할 것이라는 것을 알 수 있다^{31,39}. 그러므로 DPE계 제초제에 의해 색소체의 Protox가 저해되면 이 효소의 기질인 Protoxenol이 색소체의 외막에 축적되지 못하고 원형질막으로 이동된 후 DPE계 제초제에 내성인 원형질막의 Protox 유사효소에 의해 광활성 물질인 Proto IX으로 산화되어 축적되고 Proto IX은 광상태하에서 분자산소로부터 일중항산소를 발생하여 세포막의 지질 과산화작용을 일으켜 식물을 죽게 한다(Fig. 5). 이러한 모델로 DPE계 제초제에 의해 Protox가 저해되면 어떻게 이 효소의 기질인 Protoxenol이 아니라 반응 산물인 Proto IX이 신속하게 원형질막에 축적되면 이들 제초제에 의한 식물체의 손상이 색소체막에서보다 왜 원형질막에서 먼저 이루어지는지 설명이 가능하다. 또한 이 모델로 DPE계 제초제가 처리된 후에 만들어지는 Proto IX이 왜 엽록소와 heme 합성 과정의 다른 대사 물질로 전환되지 않고 축적되는지 설명할 수 있다. 이렇게 색소체 바깥에서 이루어지는 Protoxenol으로부터 Proto IX으로의 산화가 원형질막 이외의 장소에서도 일어날 가능성이 있으며 최근 endoplasmic re-

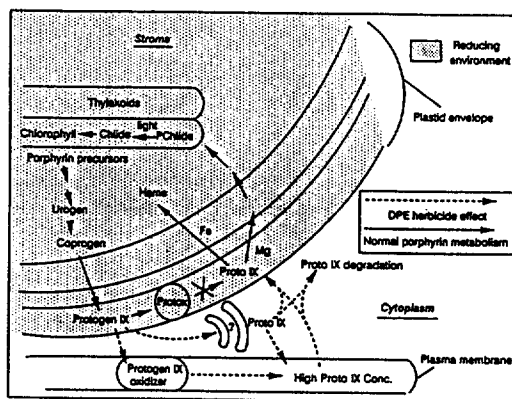


Fig. 5. Scheme for mechanism of action of DPE herbicides and other Protox-inhibiting herbicides in plant cell.(taken from reference 37)

ticulum에 이러한 활성이 존재하고 있다는 사실이 보고되었다⁵⁹⁾.

4. 색소체 Protox와 원형질막 Protox 유사효소의 비교

색소체막의 Protox와 원형질막의 Protox 유사효소는 위에 언급한 DPE계 제초제 및 환원제에 대한 반응이 서로 다르다는 점 이외에도 여러 가지 다른 측면에서 그 특징이 다르다.

색소체의 Protox는 기질특이성이 뚜렷하여 Protogen IX만을 기질로 사용하나 원형질막의 Protox 유사효소는 기질특이성이 비교적 낮아 Protogen IX 이외에 uroporphyrinogen III과 coproporphyrinogen III를 각각 uroporphyrin III과 coproporphyrin III로 산화시킬 수 있다^{17,39)}. Protogen IX에 대한 K_m 값은 보리의 경우 색소체의 Protox가 원형질막의 Protox는 26nM, 원형질막의 Protox 유사효소는 172nM이기 때문에⁴²⁾ 색소체의 Protox가 원형질막의 Protox 유사효소보다 더 효과적으로 Protogen IX과 결합하여 반응을 일으키며 원형질막의 Protox 유사효소는 Protogen IX이 충분한 때에만 작용하는 것으로 추측된다. Protogen IX이 Proto IX으로 산화되는 과정에는 6개의 전자가 이탈되는데(Fig. 4) 이 과정에서 색소체의 Protox는 분자산소만을 전자수용체로 이용하나 원형질막의 Protox 유사효소는 분자산소 이외에 퀴논(duroquinone, juglone, pyrroloquinoline quinone)과 과산화수소도 전자수용체로 이용할 수 있다^{39,41,42)}. 또한 원형질막의 Protox 유사효소는 색소체의 Protox와는 달리 peroxidase 저해제인 cyanide와 catalase에 의해 활성이 현저히 저해될^{41,42)} 뿐만 아니라 순수한 horseradish peroxidase도 Protogen IX을 Proto IX으로 산화시킬 수 있으므로⁴¹⁾ 원형질막의 Protox 유사효소가 peroxidase일 것으로 추측되고 있다. 이러한 색소체 Protox와 원형질막 Protox 유사효소의 차이점을 Table 1에 요약하여 나타내었다.

한편 동물의 Protox는 분자산소를 전자수용체로 이용하여 Protogen IX을 Proto IX으로 산화시키는 반면 박테리아의 Protox는 ubiquinone

Table 1. Comparative characteristics of plant plastid Protox and plasma membrane-bound Protox-like enzyme.

| Characteristic | Plastid | Plasma membrane |
|--------------------------|---------|-----------------|
| Herbicide susceptibility | higher | lower |
| Substrate specificity | higher | lower |
| K_m Value | lower | higher |
| Reductant inhibition | lower | higher |
| Quinone stimulation | lower | higher |
| H_2O_2 stimulation | lower | higher |
| Cyanide inhibition | lower | higher |
| Catalase inhibition | lower | higher |

도 전자수용체로 이용한다고 알려져 있다^{17,39)}. 이러한 관점에서만 본다면 색소체 Protox는 동물의 Protox와 비슷하며 원형질막의 Protox 유사효소는 박테리아의 Protox와 비슷한 특징을 가지고 있다고 할 수 있다. 또한 흥미로운 것은 박테리아의 Protox가 원형질막의 Protox 유사효소와 마찬가지로 DPE계 제초제에 대해 내성을 나타낸다는 사실이다^{11,29)}. 그러므로 박테리아의 Protox 유전자를 작물에 전이시켜 발현케 한다면 제초제 저항성 식물을 만들어 낼 수 있는 가능성이 클 것이다.

5. Protox가 제초제의 효과적인 작용점이 되는 이유

Porphyrin 합성 과정에서 Protox가 제초제의 효과적인 작용점이 되는 이유는 Protox가 색소체 외막에 위치하고 있으며 Protox의 기질인 Protogen IX이 비평면적인 구조와 저친유성의 특성을 가지고 있기 때문이다^{17,54,58)}. 즉 Protox가 저해되면 Protogen IX이 곧바로 색소체 바깥으로 이동되어 항산화제 또는 항산화효소에 의한 보호를 받을 수 없는 원형질막에서 광활성 물질인 Proto IX으로 산화되고 제초제는 Protogen IX과의 경쟁없이 계속적으로 Protox를 저해할 수 있으므로 극미량의 제초제 처리로도 엄청난 효과가 나타나게 된다 만약 제초제에 의해 Protox가 저해되어 Protogen IX이 색소체막에 축적된다면 이 이후에 Protox를 계속 저해하기 위해서는 더 많은 양의 제초제가 필

요하게 될 것이다. 또한 원형질막에는 chelatase의 활성이 없으므로 Proto IX이 엽록소나 heme의 합성의 대사 물질로 이용되지 않고 계속 축적되며 heme이나 protochlorophyllide에 의한 최종산물 저해가 이루어질 수 없기 때문에 제초제의 효과는 더욱 커지게 된다^{17,39}. Porphyrin 합성 과정 중의 Prottox 이외의 다른 효소들이 저해되어도 광활성 물질의 축적이 유지될 수 있으나 이들 효소를 효과적으로 저해시키기 위해서는 보다 많은 양의 저해제가 소용될 것이며 가능한 저해제의 종류도 비평면적 구조의 기질을 이용하는 Prottox에 대한 저해제보다 적을 것이다¹⁷.

IV. 선택성

1. 살초범위와 저항성

현재까지 화학종이 다른 수많은 Prottox 저해제초제가 발견되었으나 이들 제초제의 선택성 폭은 매우 좁다. 이들 제초제는 과수나 관상수의 재배지에서 국부처리(direct treatment)용 제초제로 사용되며 이들 제초제에 내성을 보이는 양파, 완두, 대두, 땅콩, 벼, 목화 등 몇몇 작물에는 생육기에 사용이 가능하다.

Prottox 저해제초제가 수십년 동안 사용되어 왔으나 다른 계통의 여러 제초제들과는 달리 아직까지 이들 제초제에 대한 저항성 식물이 출현하지 않고 있다^{13,35}. 이러한 점은 제초제 사용 후 수년만에 저항성 식물이 나타난 acetyl CoA carboxylase 저해제인 aryloxyphenoxypropionate 및 cyclohexanedione계 제초제나 acetolactate synthase 저해제인 sulfonylurea와 imidazolinone계 제초제 등의 경우와 비교해 볼 때 매우 특이하다³⁶. 이는 Prottox 저해제초제의 작용기작이 매우 복잡하고 저약량의 처리로도 살초작용이 수일 이내에 이루어져 저항성 식물이 출현할 만큼 충분한 도태압(selection pressure)이 가해지기가 어렵기 때문인 것으로 풀이된다¹³. 그러나 고도의 도태압을 가할 수 있는 세포현탁배양이나 조직배양 조건에서 Prottox 저해제초제에 대해 저항성인 *Chlamydomonas*

*reinhardtii*⁶³, 까마중(*Solanum ptycanthum*)⁷³, 대두⁵⁷, 담배²⁶ 등을 선발한 예가 보고되었으며 제초제의 살초작용이 Prottox 저해제초제의 경우보다 더 신속히 이루어지는 paraquat에 대한 저항성 식물도 출현하였으므로⁵⁶ Prottox 저해제초제를 반복적으로 오랫동안 사용하는 곳에서는 Prottox 저해제초제에 대한 저항성 식물이 출현할 우려가 있다.

2. 내성기작

Prottox 저해제초제에 대한 식물의 내성은 다양한 기작에 의해 이루어질 수 있다. 제초제가 잘 흡수되지 않는 잎의 특징을 가지고 있는 벼, 양배추, 양파, 소나무 등과 같은 식물은 Prottox 저해제초제에 대해 내성을 나타낸다^{1,13,43}. 반면 돼지풀(*Ambrosia artemisifolia*)이나 도꼬마리(*Xanthium strumarium*) 등과 같은 감수성 식물의 경우에는 이들 제초제의 흡수가 빠르게 이루어진다⁶¹. 같은 종의 식물간에도 제초제의 흡수 차이로 내성의 차이가 나타나는데 제초제의 흡수가 잘 이루어지지 않는 *Ipomea hederacea*는 *I. lacunosa*에 비해 이들 제초제에 대해 내성을 나타낸다²⁵. 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*)은 acifluorfen-methyl에 대해서는 감수성이지만 acifluorfen은 흡수가 잘 안 되므로 내성을 나타낸다⁵⁰.

또한 콩과식물의 경우에는 Prottox 저해제초제에 대해 내성을 나타내는데 완두나 땅콩은 fluorodifen을 대사 과정을 통해 분해할 수 있으며 대두는 acifluorfen을 분해할 수 있기 때문이다^{18,22}. 즉 대두의 잎에 흡수된 acifluorfen의 85~95%가 24시간 이내에 분해되는데 glutathione-S-transferase에 의해 diphenyl ether 결합이 깨져 만들어진 chlorophenyl 링과 nitrophenyl 링은 각각 당 또는 glutathione과의 콘주게이션이 이루어진다²²(Fig. 6).

이론적으로는 작용점인 Prottox가 저항성인 식물의 경우에는 Prottox 저해제초제에 대해 내성을 나타내어야 한다. 그러나 자연 상태의 식물에서는 아직까지 이러한 예가 보고된 바 없으며^{13,35} *Escherichia coli*나 *Bacillus subtilis*와

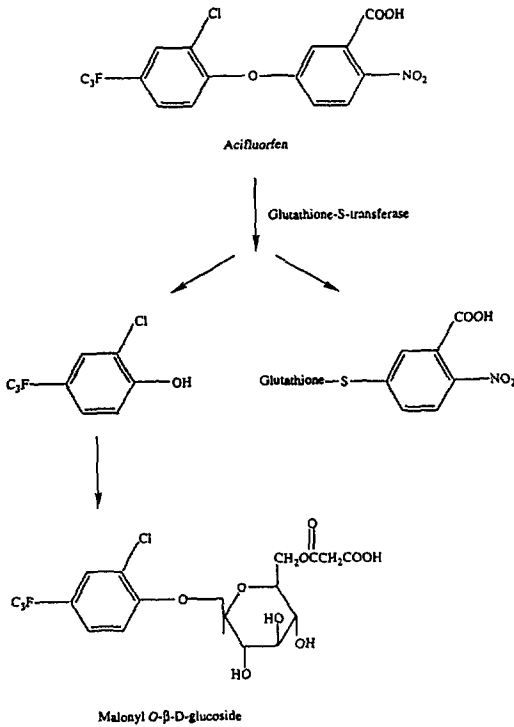


Fig. 6. Acifluorfen metabolism by glutathione-S-transferase in soybean.

같은 박테리아의 Protox는 이들 제초제에 내성인 것으로 알려져 있다^{11,29)}. 그러므로 박테리아 Protox 유전자를 식물에 전이시켜 발현케하여 제초제 저항성을 부여하고자 하는 시도가 행해지고 있다.

Protox의 저해 후 색소체 바깥으로 이동한 Protogen IX이 Proto IX으로 산화되지 않고 광활성 물질이 아닌 다른 물질로 변환되는 기작으로도 Protox 저해 제초제에 대한 내성을 설명할 수 있다. Jacobs 등²⁷⁾은 겨자(*Brassica hirta*)의 세포질에 이러한 활성이 존재하고 있음을 보고하였는데 이러한 활성때문에 Protox 저해 제초제의 처리로 겨자에 축적되는 Proto IX의 양이 다른 감수성 식물에 비해 적다고 하였으며⁶⁷⁾ Protogen IX의 분해 정도와 Protox 저해 제초제에 대한 내성 정도가 상관관계가 있다고 하였다^{27,30)}.

Protox의 저해에 의해 축적된 Proto IX은 광상태하에서 일중항산소를 발생하여 식물체를

죽게 한다^{16,24,64)}. 그러므로 일중항산소를 소거할 수 있는 항산화제의 함량이 높거나 항산화효소의 활성이 높은 식물은 그렇지 않은 식물보다 Protox 저해 제초제에 대한 내성이 높을 것으로 추측할 수 있다. 실제로 oxyfluorfen에 대한 내성은 식물체내의 ascorbate와 α -tocopherol과의 비율에 의해 좌우된다는 보고²⁰⁾가 있으며 Protox 저해 제초제에 내성인 참두(*Vicia faba*)의 경우 acifluorfen을 처리하면 ascorbate와 reduced glutathione 및 glutathione reductase이 증대되나⁶⁵⁾ 감수성인 식물의 경우에는 acifluorfen의 처리에 의해 항산화제의 함량이 뚜렷이 감소한다^{16,35)}. 그러나 활성산소의 소거능력에 의해 제초제에 대한 식물체의 내성이 결정된다고 가정하면 활성산소를 발생하여 식물체를 죽게 하는 다른 계열의 제초제에도 내성을 나타내야 할 것이다. 광합성 과정의 제1광계를 저해하는 paraquat은 전자전달체인 ferredoxin으로부터 전자를 받아 래디칼이 된 후 분자산소를 초산소음이온(superoxide anion)을 발생케 하여 식물을 죽게 하는데⁶⁾ Protox 저해 제초제에 내성인 밀이나 토마토가 paraquat에 감수성일 뿐만 아니라^{9,60)} paraquat에 내성인 개망초(*Conyza bonariensis*)는 Protox 저해 제초제에 감수성이다⁷⁰⁾. Protox 저해 제초제에 내성인 밀은 빛에 의해 일중항산소를 발생하는 rose bengal^{34,36)}에 대해서도 감수성을 나타낸다⁹⁾. 또한 Protox의 저해에 의한 Proto IX의 축적은 원형질막에서 이루어지며 항산화제와 항산화효소는 색소체내에 주로 존재하므로 Protox 저해 제초제에 대한 내성을 활성산소의 소거능력으로 설명하기는 어렵다. 한편 Protox 저해 이후 Protogen IX은 원형질막에서 제초제에 내성인 Protox 유사효소에 의해 Proto IX으로 산화되는데 이러한 Protox 유사효소의 조절에 의해 Protox 저해 제초제의 활성을 감소시킬 수 있을 것이다¹³⁾.

위에 언급한 Protox 저해 제초제에 대한 가능한 내성 기작을 Fig. 7에 나타내었다.

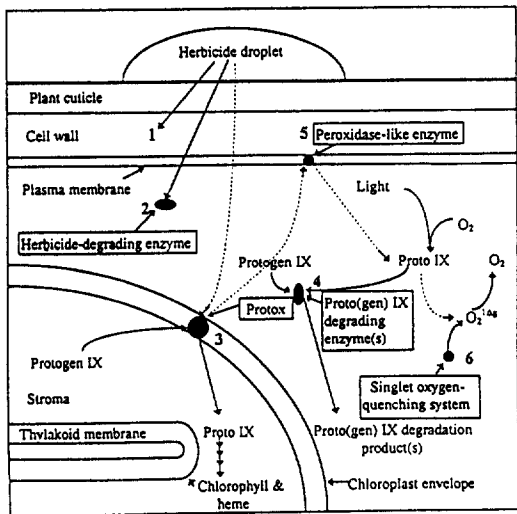


Fig. 7. Schematic of possible mechanisms of tolerance to Protox-inhibiting herbicides. The normal herbicide mechanism is denoted by dotted lines. Enzymes are black dots or ovals with names in boxes. Potential sites of tolerance are in bold numbers : 1, inhibition of uptake or sequestration of the herbicides ; 2, rapid metabolic degradation of the herbicides ; 3, herbicide-resistant Protox ; 4, degradation of extraplasmidic Protox and/or Proto IX ; 5, inactivated herbicide-insensitive, extraplasmidic Protox ; 6, quenching of singlet oxygen and other toxic oxygen species.(taken from reference 13)

V. 결론

DPE계 제초제와 이와 구조적으로 관련된 여러 제초제들은 광상태하에서 식물체의 급격한 탈수와 탈색을 유기시킴으로써 제초 효과를 나타낸다. 이들 제초제는 porphyrin 합성 과정에서 Protox가 산화되어 Proto IX으로 되는 과정에 관여하는 효소인 Protox의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 제초제에 의해 이 효소의 활성이 저해되면 효소의 기질이 아니라 특이하게도 효소의 반응 산물이 급격히 축적된다. 즉 색소체의 외막에 있는 Protox가 제초제에 의해 저해되면 이 효소의 기질인 Protox가 축적되거나 Protox가

은 친유성 분자가 아니므로 색소체의 외막에 축적되지 못하고 색소체 바깥으로 이동된다. 그 이후 Protox는 원형질막에 존재하는 제초제 내성의 Protox 유사효소의 활성에 의해 Proto IX으로 산화되는데 이 원형질막의 Protox 유사효소는 peroxidase일 것으로 추측되고 있다. 원형질막은 환원된 상태의 환경이 아니므로 이와 같은 산화 반응이 왕성하게 이루어지며 Proto IX은 친유성 분자로 원형질막에 계속적으로 축적된다. 이렇게 정상적인 porphyrin 합성 경로에서 이탈되어 원형질막에 축적된 Proto IX은 색소체나 미토콘드리아에서 Mg-Proto IX chelatase나 Fe-Proto IX chelatase에 의해 엽록소 및 heme으로의 합성에는 이용될 수 없게 된다. 원형질막에 축적된 Proto IX은 광활성 물질로 작용하여 광상태하에서 분자산소로부터 일중항 산소를 발생하여 지질 과산화작용을 일으켜 세포막을 파괴하고 이러한 과정이 계속적으로 이루어지면 식물체가 죽게 된다.

Protox 저해 제초제에 대한 식물에 내성은 제초제 흡수의 차이, 제초제의 대사, 활성산소에 대한 방어 및 Protox의 Proto IX이 아닌 다른 물질로의 변환 등 다양한 기작에 의해 이루어진다. 이외의 내성 기작으로는 Protox를 Proto IX으로 산화시키는 원형질막의 제초제 내성인 Protox 유사효소의 조절에 의해 이루어질 수 있다는 것이 최근에 제시되었다. Protox 저해 제초제의 선택성은 생활성화 과정(bioactivation stage)에서 선택성을 얻을 수 있는 지효성 제초제(proherbicides)를 개발함으로써 확대할 수 있다. 이론적으로는 약해경감제(safeners)를 감수성인 작물에 처리함으로써 Protox 저해 제초제의 사용을 확대할 수 있다. 생명공학을 이용하여 Protox 저해 제초제에 저항성인 작물을 개발하는 것은 진핵생물의 Protox가 저항성으로 바뀐 사실이 아직 명확히 입증된 바 없으므로 현재로는 쉽지 않은 시도이다. 그러나 Protox 저해 제초제 자체를 무독화시키는 효소나 Protox의 기질인 Protox를 분해하여 독성이 없는 물질로 만드는 효소를 조작하는 시도로 Protox 저해 제초제에 대한 저항성

작물을 개발할 수 있는 가능성이 있고 이러한 시도를 통해 효과가 뛰어난 이들 제초제의 사용을 확대해 나갈 수 있을 것이다. 또한 현재까지 자연상태에서 Protox 저해 제초제에 대한 저항성이 나타나지 않고 있으므로 이러한 시도가 상업적으로 연계될 가능성이 매우 크다.

VI. 인용문헌

1. Akey, W.C. and V.S. Machado. 1985. Response of onion(*Allium cepa*) to oxyfluorfen during early seedling development. *Can. J. Plant Sci.* 65 : 357-362.
2. Beale, S.I. and J.D. Weinstein. 1990. Tetrapyrrole metabolism in photosynthetic organisms. In H.A. Dailey(ed.) *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*. McGraw-Hill, New York, pp.287-391.
3. Becerril, J.M., M.V. Duke, U.B. Nandihalli, H. Matsumoto and S.O. Duke. 1992 Light control of porphyrin accumulation in acifluorfen-methyl-treated *Lemna pausicostata*. *Physiol. Plant.* 86 : 6-16.
4. Becerril, J.M. and S.O. Duke. 1989. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. *Plant Physiol.* 90 : 1175-1181.
5. Becerril, J.M. and S.O. Duke. 1989. Acifluorfen effects on intermediates of chlorophyll synthesis in green cucumber cotyledon tissues. *Pestic. Biochem. Physiol.* 55 : 119-126.
6. Bowyer, J.R. and P. Camilleri. 1987. Chemistry and biochemistry of photosystem I herbicides. In D.H. Hutson and T.R. Roberts (eds.) *Herbicides, Progress in Pesticide Biochemistry*. Wiley, Chichester, Vol.6, pp.105-145.
7. Caiger, D.P., S.A. Peterson, A.J. Smith and L.J. Rogers. 1986. Differential effects of gabaculine and laevulinic acid on protochlorophyllide regeneration. *Plant Cell Environ.* 9 : 495-499.
8. Camadro, J.M., M. Matringe, R. Scalla and P. Labbe. 1991. Kinetic studies on protoporphyrinogen oxidase inhibition by diphenylether herbicides. *Biochem. J.* 277 : 17-21.
9. Choi, J.S. 1997. Susceptibility mechanism of action of oxyfluorfen in wheat and barley. M.S. Thesis, Chungnam National University, Taejon, Korea.
10. Corriveau, J.L. and S.I. Beale. 1986. Influence of gabaculine on growth, chlorophyll synthesis, and δ -aminolevulinic acid synthase activity in *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* 45 : 9-17.
11. Dailey, T.A., P. Meisner and H.A. Dailey. 1994. Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase. *J. Biol. Chem.* 269 : 813-815.
12. Derrick, P.M., A.H. Cobb and K.E. Pallet. 1988. Ultrastructural effects of the diphenyl ether acifluorfen and the experimental herbicide M&B 39279. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32 : 153-163.
13. Duke, S.O., H.J. Lee, M.V. Duke, K.N. Reddy, T.D. Sherman, J.M. Becerril, U.B. Nandihalli, H. Matsumoto, N.J. Jacobs and J.M. Jacobs. 1997. Mechanisms of resistance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. In R. DePrado, L. Garcia-Torres and J. Jorin(eds.) *Herbicide Resistance in Crops and Weeds*. Kluwer Publishers, Amsterdam, in press.
14. Duke, S.O., J.M. Becerril, T.D. Sherman and H. Matsumoto. 1991. Photosensitizing porphyrins as herbicides. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 449 : 371-386.
15. Duke, S.O., M.V. Duke and H.J. Lee. 1993. HPLC and *in vivo* spectrophotometric detection of porphyrins in plant tissues treated with porphyrinogenic herbicides. *Z. Naturforsch.* 48C : 317-325.
16. Duke, S.O., J. Lydon, J.M. Becerril, T.D.

- Sherman, L.P. Lehnen and H. Matsumoto. 1991. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 39 : 465-473.
17. Duke, S.O., U.B. Nandihalli, H.J. Lee and M.V. Duke. 1994. Protoporphyrinogen oxidase as the optimal herbicide site in the prophyry pathway. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559 : 191-204.
 18. Eastin, E.F. 1971. Fate of fluorodifen in resistant peanut seedlings. *Weed Sci.* 19 : 261-265.
 19. Fadayomi, O. and G.F. Warren. 1976. The light requirement for herbicidal activity of diphenyl-ethers. *Weed Sci.* 24 : 598-600.
 20. Finckh, B.F. and K.J. Kunert. 1985. Vitamins C and E : An antioxidative system against herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. *J. Agric. Food Chem.* 33 : 574-577.
 21. Foyer, C.H., M. Lelandais and K.J. Kunert. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92 : 696-717.
 22. Frear, D.S., H.R. Swanson and E.R. Mansager. 1983. Acifluorfen metabolism in soybean : Diphenyl ether bond cleavage and the formation of homogluthathione, cysteine, and glucose conjugates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20 : 299-310.
 23. Girotti, A.W. 1990. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* 51 : 497-509.
 24. Haworth, P. and F.D. Hess. 1988. The generation of singlet oxygen (1O_2) by the nitro-diphenyl ether herbicide oxyfluorfen is independent of photosynthesis. *Plant Physiol.* 86 : 672-676.
 25. Higgins, J.M., T. Whitwell, F.T. Corbin, G.E. Carter and H.S. Hill. 1988. Absorption, translocation, and metabolism of acifluorfen and lactofen in pitted moningglory (*Ipomea lacunosa*) and ivyleaf morningglory (*Ipomea hederacea*). *Weed Sci.* 36 : 141-145.
 26. Ichinose, K., F.S. Che, Y. Kimura, A. Matsunobu, F. Sato and S. Yoshida. 1995. Selection and characterization of protoporphyrinogen oxidase inhibiting herbicide(S-23142) resistant photomixotrophic cultured cell of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.* 146 : 693-698.
 27. Jacobs, J.M., J.M. Wehner and N.J. Jacobs. 1994. Porphyrin stability in plant supernatant fractions : Implications for the action of prophyrinogenic herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 50 : 23-30.
 28. Jacobs, J.M. and N.J. Jacobs. 1993. Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) plastids : Effect of diphenyl ether herbicides. *Plant Physiol.* 101 : 1181-1187.
 29. Jacobs, J.M., N.J. Jacobs, S.F. Borotz and M.L. Guerinot. 1990. Effects of photobleaching herbicide, acifluorfen-methyl, on protoporphyrinogen oxidation in barley organelles, soybean root mitochondria, soybean root nodules, and bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 280 : 369-375.
 30. Jacobs, J.M., N.J. Jacobs and S.O. Duke. 1996. Protoporphyrinogen destruction by plant extracts and correlation with tolerance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 55 : 77-83.
 31. Jacobs, J.M., N.J. Jacobs, T.D. Sherman and S.O. Duke. 1991. Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. *Plant Physiol.* 97 : 197-203.
 32. Kannangara, C. and A. Schouboe. 1985. Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in greening barley leaves. VII. Glutamate semialdehyde accumulation in gabaculine treated leaves. *Carlsberg Res. Commu.* 50 : 179-191.
 33. Kenyon, W.H., S.O. Duke and K.C. Vanghn.

1995. Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24 : 240-250.
34. Knox, J.P. and A.D. Dodge. 1984. Photodynamic damage to plant tissue by rose bengal. *Plant Sci. Lett.* 37 : 3-7.
35. Komives, T. and G. Gullner. 1994. Mechanism of plant tolerance to photodynamic herbicides. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 559 : 177-190.
36. Lee, H.J. and K.Y. Cho. 1996. Light-dependent cellular leakage from cucumber cotyledon discs treated with δ -aminolevulinic acid, oxyfluorfen, and rose bengal. *J. Photosci.* 3 : 1-7.
37. Lee, H.J., M.D. Ball and C.A. Rebeiz. 1991. Intraplastidic localization of the enzymes that convert δ -aminolevulinic acid to protoporphyrin IX in etiolated cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 96 : 910-915.
38. Lee, H.J., M.D. Ball, R. Parham and C.A. Rebeiz. 1992. Chloroplast biogenesis 65 : Enzymic conversion of protoporphyrin IX to Mg-protoporphyrin IX in a subplastidic membrane fraction of cucumber etioplasts. *Plant Physiol.* 99 : 1134-1140.
39. Lee, H.J., M.V. Duke and S.O. Duke. 1993. Cellular localization of protoporphyrinogen oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves : Relationship to mechanism of action of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 102 : 881-889.
40. Lee, H.J., M.V. Duke, J.H. Birk, M. Yamamoto and S.O. Duke. 1995. Biochemical and physiological effects of benzheterocycles and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 2722-2727.
41. Lee, H.J. and S.O. Duke. 1994. Peroxidase involvement in the accumulation of protoporphyrin IX in acifluorfen-methyl-treated plant tissues. *Plant Physiol.* 105 : S-125.
42. Lee, H.J. and S.O. Duke. 1994. Protoporphyrinogen IX-oxidizing activities involved in the mode of action of peroxidizing herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 42 : 2610-2618.
43. Lee, J.J., H. Matsumoto, J.Y. Pyon and K. Ishizuka. 1991. Mechanism of selectivity of diphenyl ether herbicides oxyfluorfen and chlomethoxynil in several plants. *Weed Res. Japan* 36 : 162-170.
44. Lehnen, L.P., T.D. Sherman, J.M. Becerril and S.O. Duke. 1990. Tissue and cellular localization of acifluorfen-induced porphyrins in cucumber cotyledons. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37 : 239-248.
45. Lydon, J. and S.O. Duke. 1988. Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the *p*-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 31 : 74-83.
46. Matringe, M., J.M. Camadro, M.A. Block, J. Joyard, R. Scalla, P. Labbe and R. Douce. 1992. Localization within chloroplasts of protoporphyrinogen oxidase, a target enzyme for diphenyl ether-like herbicides. *J. Biol. Chem.* 267 : 4646-4651.
47. Matringe, M., J.M. Camadro, P. Labbe and R. Scalla. 1989. Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target of diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260 : 231-235.
48. Matringe, M., R. Mornet and R. Scalla. 1992. Characterization of [3 H] acifluorfen binding to purified pea etioplasts, and evidences that protoporphyrinogen oxidase specifically binds acifluorfen. *Eur. J. Biochem.* 209 : 861-868.
49. Matringe, M. and R. Scalla. 1988. Effects of acifluorfen-methyl on cucumber cotyledons : Protoporphyrin accumulation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32 : 164-172.
50. Matsumoto, H. and S.O. Duke. 1990. Aciflu-

- ofen-methyl effects on porphyrin synthesis in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746. J. Agric. Food Chem. 38 : 2066-2071.
51. Meller, E.H. and M.L. Gassman. 1981. The effect of levulinic acid and 4,6-dioxoheptanoic acid on the metabolism of etiolated and green barley leaves. Plant Physiol. 67 : 728-732.
 52. Mito, N., R. Sato, M. Miyakado, H. Oshio and S. Tanaka. 1991. *In vitro* mode of action of *N*-phenyl imide photobleaching herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 40 : 128-135.
 53. Nandihalli, U.B., M.V. Duke and S.O. Duke. 1992. Relationships between molecular properties and biological activities of *O*-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides. J. Agric. Food Chem. 40 : 1993-2000.
 54. Nandihalli, U.B., M.V. Duke and S.O. Duke. 1992. Quantitative structure-activity relationships of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting diphenyl ether herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 43 : 193-211.
 55. Nandihalli, U.B., T.D. Sherman, M.V. Duke, J.D. Fisher, V.A. Musco, J.M. Becerril and S.O. Duke. 1992. Correlation of protoporphyrinogen oxidase inhibition by *O*-phenyl pyrrolidino- and piperidino-carbamates with their herbicidal effects. Pestic. Sci. 35 : 227-235.
 56. Powles, S.B. and J.A.M. Holtum. 1994. Herbicide Resistance in Plants : Biology and Biochemistry. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 353p.
 57. Pronprom, T., H. Matsumoto, K. Usui and K. Ishizuka. 1994. Characterization and tolerance in selected soybean line. Pestic. Biochem. Physiol. 50 : 107-114.
 58. Reddy, K.N., U.B. Nandihalli, H.J. Lee, M.V. Duke and S.O. Duke. 1995. Predicting activity of protoporphyrinogen oxidase inhibitors by computer-aided molecular modeling. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 589 : 211-226.
 59. Retzlaff, K. and P. Böger. 1996. An endoplasmic reticulum plant enzyme has protoporphyrinogen IX oxidizing activity. Pestic. Biochem. Physiol. 54 : 105-114.
 60. Ricotta, J.A. and J.B. Masiunas. 1992. Acifluorfen tolerance in *Lycopersicon*. Weed Sci. 40 : 413-417.
 61. Ritter, R.L. and H.D. Coble. 1981. Penetration, translocation, and metabolism of acifluorfen in soybean(*Glycine max*), common ragweed(*Ambrosia artemisiifolia*), and common cocklebur(*Xanthium pensylvanicum*). Weed Sci. 29 : 474-480.
 62. Sato, R., E. Nagano, H. Oshio, K. Kamoshita and M. Furuya. 1987. Wavelength effect on the action of a *N*-phenylimide S-23142 and a diphenylether acifluorfen-ethyl in cotyledons of cucumber(*Cucumis sativa* L.) seedlings. Plant Physiol. 85 : 1146-1150.
 63. Sato, R., M. Yamamoto, H. Shibata, H. Oshio, E.H. Harris, N.W. Gillaham and J.E. Boynton. 1994. Characterization of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* resistant to protoporphyrinogen oxidase inhibitors. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 559 : 91-104.
 64. Scalla, R. and M. Matringe. 1994. Inhibitors of protoporphyrinogen oxidase as herbicides : Diphenyl ethers and related photobleaching molecules. Rev. Weed Sci. 6 : 103-132.
 65. Schmidt, A. and K.J. Kunert. 1986. Lipid peroxidation in higher plants : The role of glutathione reductase. Plant Physiol. 82 : 700-702.
 66. Sherman, T.D., M.V. Duke, R.D. Clark, E.F. Sanders, H. Matsumoto and S.O. Duke. 1991. Pyrazole phenyl ether herbicides inhibit protoporphyrinogen oxidase. Pestic. Biochem. Physiol. 40 : 236-245.
 67. Sherman, T.D., J.M. Becerril, H. Matsumoto, M.V. Duke, J.M. Jacobs, N.J. Jacobs and S. O. Duke. 1991. Physiological basis for differential sensitivities of plant species to pro-

- toporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 97 : 280-287.
68. Smith, A.G., O. Marsh and G.H. Elder. 1993. Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. *Biochem. J.* 292 : 503-508.
 69. Varsano, R., M. Matringe, N. Nagnin, R. Mornet and R. Scalla. 1990. Competitive interaction of three peroxidizing herbicides with the binding of [³H] acifluorfen to corn etioplast membranes. *FEBS Lett.* 272 : 106-108.
 70. Vaughn, K.C., M.A., Vaughn and P. Camilleri. 1989. Lack of cross-resistance of paraquat-resistant hairy fleabane(*Conyza bonariensis*) to other toxic oxygen generators indicates enzymatic protection is not the resistance mechanism. *Weed Sci.* 37 : 5-11.
 71. Witkowski, D.A. and B.P. Halling. 1989. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. *Plant Physiol.* 90 : 1239-1242.
 72. Wright, T.R., E.P. Fuerst, A.G. Ogg, U.B. Nandihalli and H.J. Lee. 1995. Herbicidal activity of UCC-C4243 and acifluorfen is due to inhibition of protoporphyrinogen oxidase. *Weed Sci.* 43 : 47-54.
 73. Yu, C.Y. and J.B. Masiunas. 1992. Characterization of acifluorfen tolerance in selected somaclones of eastern black nightshade(*Solanum ptycanthum*). *Weed Sci.* 40 : 408-412.